

- White M. J. D. 1954. Animal cytology and evolution. Cambridge.  
 Whitt D. D., B. C. Carlton. 1968. J. Bact., **96**, 4: 1273—1280.  
 Yaniv M., B. G. Barrell. 1969. Nature, **222**, 5190: 278—279.  
 Young W. J. 1966. J. Hered., **57**: 58—60.  
 Young W. J., J. E. Proter, B. Childs. 1964. Science, **143**, 3602: 140—141.  
 Zachau H. G. 1968. In: Structure and function of transfer RNA and 5s RNA. London—N. Y., Acad. Press: 169—174.  
 Zachau H. G., D. Dütting, H. Feldmann. 1966. Hoppe-Seyl. Zs. Physiol. Chem., **347**, 1—3: 212—235.

## ИЗУЧЕНИЕ СПОРУЛЯЦИИ У НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ *CANDIDA* И *TORULOPSIS*

Я. О. Соом, Б. В. Сумаров

Многие представители аспорогенных дрожжей родов *Candida* и *Torulopsis* обладают свойствами, которые отсутствуют, как правило, у обычно используемых для генетических исследований спорогенных форм. К таким признакам можно отнести диморфизм клеток (клеточно-гифовый диморфизм) и способность использовать углеводороды. Следует также отметить, что к аспорогенным относят дрожжи, употребляемые в микробиологической промышленности для получения кормовых белково-витаминных концентратов, — так называемые «кормовые дрожжи». В связи с невозможностью проведения гибридологического анализа у аспорогенных дрожжей генетическая детерминация их признаков до сих пор не изучена, а следовательно, не разработаны и теоретические основы селекции производственных форм дрожжей. В связи с этим встает вопрос о поиске у дрожжей, считающихся аспорогенными, полового процесса и о возможности их гибридизации. В настоящее время работы, посвященные исследованию этой проблемы, немногочисленны, а полученные результаты противоречивы.

Ван дер Вальт (Walt, van der, 1967) обнаружил смену дипло- и гаплофаз у некоторых штаммов *Candida albicans* и *Cryptococcus albidus*, но не использовал возможности гибридизации у изученных им форм. Виндиш (Windisch, 1940, 1952) установил наличие аскоспор у *Candida pulcherrima* и *Pseudomonas (Candida) albomarginata*. Однако работы Виндиша были подвергнуты критике, на что указывают в своем обзоре Скиннер и Флетчер (Skinner a. Fletcher, 1960). Основные возражения основывались на том, что при визуальном наблюдении за споры можно принять капли жира, накапливаемые дрожжевыми клетками некоторых форм дрожжей. Виды дрожжей, с которыми работал Виндиш, как раз характеризовались этим свойством (Kockova-Kratochvilova, Kutkova, 1961).

Викерхэм и Бартон (Wickerham a. Burton, 1952, 1954) показали возможность скрещивания у некоторых аспорогенных штаммов из родов *Torulopsis* и *Candida*. В результате смешивания двух штаммов *Torulopsis sphaerica* авторы выделили типичную спорогенную форму *Zygosaccharomyces lactis*. При смешивании разных штаммов *Candida* с последующей длительной инкубацией на споруляционной среде в некоторых случаях были обнаружены аски со спорами. Аски встречались крайне редко, и в дальнейшем их анализ не проводился.

Следует отметить, что смешивание клеток двух разных штаммов и попытка индуцировать споруляцию в смешанной популяции является малоэффективным способом изучения возможности гибридизации. Ко-

споруляционная активность исследуемых штаммов может оказаться весьма низкой, а при смешивании прототрофных штаммов образующиеся зиготы не имеют, как правило, заметного селективного преимущества. Если учесть при этом, что далеко не все диплоидные клетки спорулируют, то становится очевидным, что редко образующиеся аски могут ускользнуть из поля зрения исследователей. Так, Вакерхэмом (Wickerham, 1952) было показано, что при скрещивании штаммов *Hansenula* разного географического происхождения образуются зиготы, которые либо спорулируют очень плохо, либо совсем не спорулируют. Обнаружение продуктов мейоза затруднено и тогда, когда споры после их образования высвобождаются из асков. В таком случае споры трудно отличить от вегетативных клеток, поскольку размеры последних могут сильно варьировать.

Способность к споруляции является ключевым признаком при определении родовой принадлежности дрожжей. Тем не менее в работах, посвященных изучению биологии и систематике дрожжей (Кудрявцев, 1954; Kockova-Kratochvilova, Kutkova, 1961; Phaff et al., 1966), подчеркивается значительная изменчивость этого признака и отмечается, что длительное поддержание музейных культур на искусственных средах приводит к ослаблению их способности спорулировать. Вследствие этого становится возможным обнаружение спорообразования при изменении условий культивирования у музейных неспорулирующих штаммов.

В заключение следует отметить, что мейоз и спорообразование — сложные процессы, находящиеся под контролем многих генов. Так, у *Schizosaccharomyces pombe* мейоз контролируется по меньшей мере пятью генами, а процесс споруляции находится под контролем не менее чем 18 генов, причем одной мутации по любому из этих генов достаточно для того, чтобы мутант утратил способность образовывать споры (Bresch et al., 1968).

Приведенные факты могут служить, по всей вероятности, достаточным основанием для поиска смены гапло- и диплофаз у видов дрожжей, считающихся асперогенными. В связи с этим целью данной работы было изучение возможности образовывать споры различными штаммами дрожжей родов *Candida* и *Torulopsis*.

**Материалы и методы.** В качестве исходного материала в настоящей работе использованы штаммы *Candida* и *Torulopsis*, полученные нами из Всесоюзной коллекции микроорганизмов (ВКМ) и коллекции ВНИИ синтез белок. При работе с ними применялись следующие среды:

1. Полная среда (Захаров, 1961):  $K_2HPO_4$  — 2 г,  $MgSO_4$  — 1 г,  $(NH_4)_2SO_4$  — 1 г, глюкоза — 20 г, дрожжевой автолизат — 10 мл, агар-агар — 20 г, дистиллированная вода — 1 л.

2. Полная среда с пептоном. В 1 л полной среды добавляется 20 г пептона.

3. Минимальная среда. Отличается от полной среды отсутствием дрожжевого автолизата. Кроме того, она включает в свой состав биотин (2  $\mu$ /л), тиамин (200  $\mu$ /л),  $\beta$ -аланин (500  $\mu$ /л).

4. Среда с парафином — СА (состав среды, рекомендованный ВНИИ синтез белок):  $NH_4H_2PO_4$  — 2 г,  $(NH_4)_2HPO_4$  — 0,5 г,  $MgSO_4$  — 0,2 г,  $K_2SO_4$  — 0,2 г, дрожжевой автолизат — 1 мл, агар-агар — 25 г, дистиллированная вода — 1 л. При работе с этой средой парафин (гексадекан) стерилизуют отдельно. После разлива среды на крышки чашек с внутренней стороны пинцетом помещают кружки фильтровальной бумаги и на них лопаточкой наносят по 0,4–0,5 мл парафина. Применение такой методики позволяет дрожжам использовать летучие фрак-

ции парафинов. Иногда для выращивания штаммов в среду такого состава добавляли 2% глюкозы, а парафин исключали (среда С. Дрожжевой автолизат может быть заменен набором микроэлементов и витаминов, которых в ряде случаев требуют «дикие» формы дрожжей.

5. Преспоруляционная среда с высокой концентрацией глюкозы (Parker, 1967). В 1 л дистиллированной воды содержится: глюкоза — 100 г, дрожжевого автолизата — 8 г, пептона — 3 г, агар-агара — 20 г.

6. Преспоруляционная среда с высокой концентрацией хлористого натрия: NaCl — 50 г, глюкоза — 2,5 г,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 4,4 г, дистиллированная вода — 1 л.

7. Среда для споруляции с ацетатом натрия (Fowell, 1951): ацетат натрия — 10 г, KCl — 5 г, агар-агар — 20 г, дистиллированная вода — 1 л.

8. Среда для споруляции с ацетатом калия (Parker, 1967): ацетат калия — 10 г, глюкоза — 0,05 г, дрожжевой автолизат — 1 мл, дистиллированная вода — 1 л.

В некоторых слывах использовалась минимальная среда без витаминов, а также среды, включающие этноны (0,02 M).

Все штаммы, за исключением специальных случаев, инкубировались при 30°. При использовании преспоруляционных сред штаммы выращивали на них 24 часа, а затем переносили на среды для споруляции. Анализ споруляции проводился после 6 суток инкубирования штаммов на споруляционной среде. Для проведения тетрадного анализа споруляции диплоидных штаммов индуцировалась на среде с ацетатом натрия. Тетрадный анализ осуществлялся с помощью микроанализатора MM-1.

#### Обнаружение споруляции у некоторых штаммов, относимых к *Candida* и *Torulopsis*

Для индукции споруляции мы использовали методы, обычно применяемые для этой цели в работе с разными представителями сахаромикетов. При этом нужно отметить, что споруляционные среды, употребляемые в нашей работе, обычно не используются при определении систематического положения дрожжей. В опытах по индукции споруляции варьировали состав сред для предварительного культивирования штаммов, состав споруляционной среды и температуру культивирования. Всего было изучено влияние 12 комбинаций указанных факторов. В качестве преспоруляционной среды использовалась либо обычная полная среда, либо полная среда с пептоном. Кроме того, мы использовали преспоруляционные среды, создающие повышенное осмотическое давление. Это либо среда, богатая глюкозой, либо среда с высокой концентрацией хлористого натрия. В качестве среды для споруляции использовалась среда, содержащая ацетат натрия, или среда, содержащая ацетат калия. Большинство сахаромикетов лучше всего споруют при 30°. Однако известны формы, спорующие только при более низкой температуре (Wilson, 1959; Johnston, 1965). В связи с этим для инкубации штаммов были выбраны две температуры: 30° и 20°.

Среди 50 исследованных штаммов *Candida* и *Torulopsis* были найдены два спорующих. Это — *Torulopsis utilis* var. *major* (syn. *Candida utilis* Y-768 ВКМ) и *Candida guilliermondii* Y-41 ВКМ.

При разных способах индукции споруляционная активность была различной, однако максимальный процент споруляции клеток наблюдался при инкубации в среде с ацетатом калия. Штаммы выращивались на

преспуляционной среде с 10% глюкозы, а затем переносились на среду с ацетатом калия. На рис. 1 представлен спорулирующий штамм Y-768.

Спорулирующие штаммы оказались этионинчувствительными и были неспособны использовать парафин. Выделенные в результате проведенного тетрадного анализа моноспоровые клоны также были этионинчувствительными и не использовали углеводороды. При вынесении их на ацетатную среду они спорулировали, что дало основание сделать вывод о гомоталличности штаммов Y-41 и Y-768. Для подтверждения этого один из моноспоровых клонов штамма Y-768 был подвергнут дальнейшему тетрадному анализу. Все моноспоровые клоны, выделенные из него, оказались способными образовывать аски. Из этого же клона было исследовано 10 двуспоровых асков для того, чтобы обна-

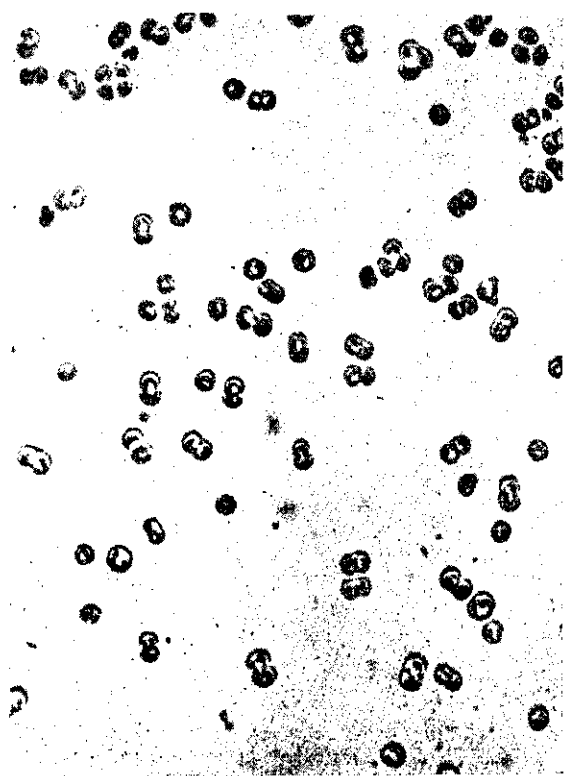


Рис. 1. Споруляция штамма Y-768.

ружить возможные нарушения мейоза. Однако среди данной выборки мутантов с нарушенным мейозом не оказалось: все моноспоровые клоны на ацетатной среде спорулировали, образуя трех- и четырехспоровые аски. Следовательно, образование двуспоровых асков в данном случае не детерминировано генетически. Для дальнейшей работы из штамма Y-768 нами был выделен этионинустойчивый мутант. В 6 исследованных тетрадах наблюдалось моногенное расщепление по этионинчувствительности 2:2. В данном случае этионинустойчивость оказалась доминантным признаком. Эти результаты дали основание считать, что мы имеем дело с истинным мейозом, а также, что вегетативная ста-

дия изученного штамма диплоидна.\* Результаты тетрадного анализа штаммов Y-41 и Y-768 приведены в таблице.

Необходимо указать на высокую фертильность исследуемых штаммов. Так, во всех случаях жизнеспособность спор была близка к 100%.

Результаты тетрадного анализа штаммов Y-41 и Y-768

Штамм	Колич. проанализированных 4-споровых асков	Число асков, давших расщепление по этноинустойчивости		Способность моноспоровых клонов	
		4eth <sup>5</sup> :0eth <sup>5</sup> Г	2eth <sup>5</sup> :2eth <sup>5</sup> Г	спорулировать	уславливать угасавшими
Y-41 . . . . .	8	8	0	+	—
Y-768 . . . . .	18	18	0	+	—
Y-768* . . . . .	6	5	0	+	—
Y-768-eth <sup>5</sup> ** . . . . .	6	0	6	+	—

\* Один из моноспоровых клонов, выделенный при проведении тетрадного анализа штамма Y-768; \*\* этноинустойчивый мутант штамма Y-768; eth<sup>5</sup> — чувствительность к этионину; eth<sup>5</sup> — устойчивость к этионину; плюс — наличие данного признака, минус — отсутствие данного признака.

### Изучение прорастания спор и диплоидизации штамма Y-768

Наряду с генетическим изучением споруляции нами было проведено предварительное цитологическое исследование характера прорастания спор в асках и процесса диплоидизации у штамма Y-768.

Наблюдение за прорастанием спор в асках выявило корреляцию между временем прорастания спор и их количеством в аске. Равные всего в полной жидкой среде начинали прорастать споры двуспоровых асков — через 1—1,5 часа. Первые проростки, формирующиеся из этих спор, копулировали между собой, образуя широкие копуляционные каналы. В дальнейшем одна из стенок копуляционного канала выпячивается, и образуется грушевидная «почка», которая превращается в типичную по внешнему виду вегетативную диплоидную клетку. Из каждого копуляционного канала, по всей видимости, образуется только одна такая «почка». От первичной вегетативной клетки отпочковываются дочерние вегетативные клетки, которые по морфологии не отличаются от материнской.

Прорастание трех- и четырехспоровых асков начинается несколько позднее. Обычно споры в аске прорастали неодновременно. Одна или две споры образовывали проростки ранее остальных спор. Проростки имели вид малоконтрастных крупных клеток. От них в свою очередь отпочковывались такие же дочерние клетки, которые вместе с материнской клеткой образовывали скопления клеток — «комки». Последующая копуляция наблюдалась или среди клеток, составляющих «комки», или между клетками «комка» и первым проростком аскоспоры, расположенным вблизи «комка». Не исключена также возможность автодиплоидизации клеток, образующих «комки». Часть двуспоровых асков прорастала одновременно с трех- и четырехспоровыми, с образованием таких же «комков» клеток, которые были отмечены при прорастании трех- и четырехспоровых асков.

В настоящее время у штаммов Y-41 и Y-768 выделены ауксотрофные мутанты, обладающие гетеротрофией и ксерофилией, образующие псевдомицелий. При работе с ауксотрофными мутантами обнаружена диплоидизация. Результаты этой работы опубликованы в печати. Для характеристики штаммов Y-41 и Y-768, переданы во Всесоюзный институт микробиологии проф. В. И. Курдюкову для окончательного определения их систематического положения.

В монографии Фаффа с соавт. (Phaff et al., 1966) отмечается, что у гомоталлических дрожжей в основном наблюдается автодиплоидизация, при которой первая «почка» уже является диплоидной. У изученного нами штамма имеется, вероятно, кратковременная гаплоидная вегетативная стадия.

### Изменчивость признака «способность спорулировать»

Необходимо отметить, что мы исследовали два образца штамма Y-768, полученные в разное время из Всесоюзной коллекции микроорганизмов. Будучи идентичными в отношении целого ряда признаков, они различаются по способности спорулировать. Первый образец, полу-

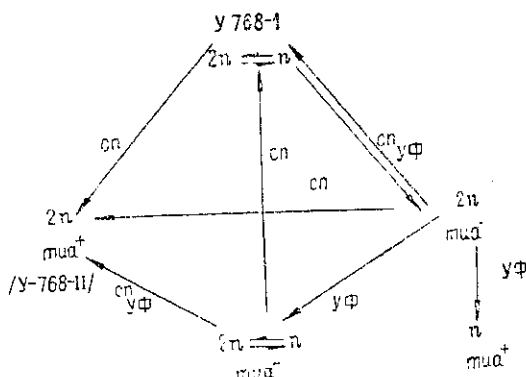


Рис. 2. Изменчивость признака «способность спорулировать» у штамма Y-768.

$2n = n$  — наличие смены гапло- и диплофаз; сп — мутанты, полученные спонтанно; уф — мутанты, индуцированные УФ-лучами; тиа — потребность в тиамине.

ченный в 1965 г., спорулировал (в дальнейшем он обозначается Y-768-I), а второй образец, полученный в 1968 г., не спорулировал (в дальнейшем он обозначается Y-768-II). Это наводит на мысль об изменчивости, связанной с утратой или приобретением данного признака. В связи с этим нами была предпринята попытка изучения возможных вариантов изменчивости по данному признаку. Результаты представлены на рис. 2. Споруляция рассматривается как следствие редукционного деления, т. е. мейоза. Что касается неспорулирующих форм, то нами показана только та степень плоидности, которую мы считали наиболее вероятной. Все отмеченные на схеме переходы показаны на примере по крайней мере трех мутантов.

Взяв за основу музейную культуру Y-768-I, мы получили два типа мутантов, утративших способность спорулировать. Одни из них — прототрофы (идентичны Y-768-II), другие несли ауксотрофность — неполный блок в синтезе тиамина. На фоне данных мутантов были получены слаборастущие клоны с мелкими, слегка комкующимися клетками (характерными для гаплоидов у сахаромисетов). Это дало нам основание предполагать, что мы имеем дело с гаплоидными формами штамма Y-768.

На основе тиаминзависимых штаммов мы получили реверсы как спорулирующие (Y-768-I), так и неспорулирующие (Y-768-II). Кроме того, были получены тиаминзависимые формы, способные к споруляции. Эти спорулирующие тиаминзависимые штаммы могли переходить в разряд прототрофных как спорулирующих (Y-768-I), так и неспорулирующих (Y-768-II).

Представленные данные говорят о том, что система мейотического деления у изученного штамма и, возможно, у некоторых гомоталлических штаммов *Candida* и *Torulopsis* может быть нестабильной, и, вероятно, требуется в ряде случаев дополнительная селекция для того, чтобы стабилизировать этот признак. С другой стороны, открывается возможность поиска мутантов, обладающих способностью спорулировать, среди аспорогенных штаммов.

Авторы приносят благодарность С. Г. Инге-Вечтомову и К. В. Квитко за всестороннюю помощь, оказанную в ходе выполнения этой работы.

### ВЫВОДЫ

1. У двух штаммов из Всесоюзной коллекции микроорганизмов, Y-768 и Y-41, ранее определенных как *Torulopsis utilis* var. *major* (syn. *Candida utilis*) и *Candida guilliermondii*, обнаружена споруляция.
2. Показано наличие смены дипло- и гаплофаз у этих штаммов.
3. Установлено, что спорующие штаммы являются гомоталлическими.
4. Изучен характер прорастания аскоспор и диплоидизации у штамма *Torulopsis utilis* Y-768.
5. Исследована изменчивость признака «спорообразование».

### Summary

Sporulation ability was shown for two yeast strains (Y-768 and Y-41) from the All-Union Collection of Microorganisms. The strains have been identified previously as *Torulopsis utilis* var. *major* (syn. *Candida utilis*) and *Candida guilliermondii* respectively.

The sporulation discovered was shown to present transition from diplo- to haplo-phase. The either strains studied are homothallic. The process of ascospore germination and of diploidization was studied in the strain Y-768.

Variation of the character "sporulation ability" has been analyzed.

### ЛИТЕРАТУРА

- Захаров И. А. 1961. Исслед. по генетике, 1. Изд. ЛГУ: 38—47.
- Кудрявцев В. И. 1954. Систематика дрожжей. М., Изд. АН СССР.
- Bresch C., G. Müller a. R. Egel. 1968. Molec. Gen. Genetics, 102: 301—306.
- Fowell R. R. 1951. Nature, 170: 587.
- Iverson W. P. 1967. Appl. Microbiol., 15, 4: 966—967.
- Johnston J. R. 1965. J. Inst. Brew., 71, 2: 130—135.
- Kockova-Kratochvilova A. a. M. Kutkova. 1961. Atlas kvasinek. Praha—Bratislava, St. Nakl. Tech. Lit.
- Parker G. H. 1967. Phil. D. Thesis, the University of Rochester. Rochester—New York.
- Phaff H. J., M. W. Miller a. E. M. Mraz. 1966. The life of yeasts. Cambridge, Mass., Harvard University Press.
- Skinner C. E. a. Fletcher D. W. 1960. Bacteriol. Rev., 24, 4: 397—416.
- Walt J. P., van der, A. van Lewenhoeck. 1967. J. Microbiol. and Serol., 33, 3: 246—256.
- Wickerham L. J. 1952. Ann. Rev. Microbiol., 6: 317—332.
- Wickerham L. J. a. K. A. Burton. 1952. J. Bacteriol., 63, 4: 449—451.
- Wickerham L. J. a. K. A. Burton. 1954. J. Bacteriol., 68, 5, 594—597.
- Wilson J. Y. 1959. Heredity, 13, 2: 263—267.
- Windisch S. 1940. Arch. Microbiol., 11: 368—396.
- Windisch S. 1952. Geiger. Zentr. Bacteriol. Parasitenk., Abt. II, 107: 84—98.